

OPTIMASI TRANSPLANTASI MENGGUNAKAN SEL DONOR DARI IKAN GURAME MUDA DAN IKAN NILA TRIPLOID SEBAGAI RESIPIEN

(OPTIMIZATION OF TRANSPLANTATION USING DONOR CELLS FROM YOUNG GIANT GOURAMY AND TRIPLOID NILE TILAPIA AS RECIPIENT)

Alimuiddin¹⁾, M. Zairin Jr¹⁾, Harton Arfah¹⁾

ABSTRACT

Testicular cell transplantation technology can be used in fish seed production engineering. In this study, optimization of transplantation using donor cells from young gouramy and triploid tilapia (3N) as recipient. Triploid tilapia is produced using heat shock method. The testes of male gouramy (body weight of 400-850 g) was dissociated using 0.5% trypsin. Dissociated testicular cells was injected into the peritoneal cavity of tilapia larvae. Analysis of donor cell colonization was carried out using PCR method with DNA template that had been extracted from the gonad of 2-month-old tilapia. PCR was performed using specific primers for the growth hormone gene and β -actin as an internal control of DNA loading. The results of nucleoli preparation showed that the success of triploidization was 88.5%. The gonad size of diploid (2N) and 3N recipient were relatively similar, while in not transplanted 3N tilapia was rudimentary. PCR results showed that the transplanted 3N tilapia has a DNA band of the same size with gouramy, while in control was not. This indicated that donor cells have been colonized in the gonads of recipient. The donor cell colonization in recipient 3N (78%) was higher than that of 2N (50%). Further research is required to determine the ability of donor cells differentiate into sperm and eggs in recipient gonad.

Keywords : Spermatogonia, cell transplantation, triploid, giant gouramy.

ABSTRAK

Teknologi transplantasi sel testikular dapat digunakan dalam rekayasa produksi benih ikan. Pada penelitian ini dilakukan optimasi transplantasi menggunakan sel donor dari ikan gurame muda dan resipien berupa ikan nila triploid. Ikan nila triploid diproduksi menggunakan metode kejutan panas. Testis dari ikan gurame jantan (berat tubuh 400-850 g) didisosiasi menggunakan tripsin 0,5%. Sel hasil disosiasi selanjutnya disuntikkan ke rongga perut larva ikan nila. Analisis kolonisasi sel donor dilakukan menggunakan metode PCR dengan cetakan DNA yang diekstraksi dari gonad ikan nila umur sekitar 2 bulan. PCR dilakukan menggunakan primer spesifik bagi gen penyandi hormon pertumbuhan dan β -aktin sebagai kontrol internal *loading* DNA. Hasil preparasi nukleolus menunjukkan bahwa keberhasilan triploidisasi adalah 88,5%. Ukuran gonad ikan nila resipien 2N dan 3 N relatif sama, sedangkan gonad ikan nila 3N tanpa transplantasi adalah rudimenter. Hasil PCR menunjukkan bahwa ikan nila triploid hasil transplantasi mempunyai pita DNA dengan ukuran yang sama pada ikan gurame dan tidak ada pada ikan nila kontrol bukan hasil transplantasi. Hal ini menunjukkan bahwa sel donor dari ikan gurame telah terkolonisasi dalam gonad ikan nila triploid. Keberhasilan kolonisasi menggunakan resipien 3N (78%) lebih tinggi dibandingkan dengan resipien 2N (50%). Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk melihat kemampuan sel donor berdiferensiasi menjadi sperma dan telur dalam gonad ikan nila resipien.

Kata kunci : Spermatogonia, transplantasi sel, triploid, ikan gurame.

PENDAHULUAN

Ikan gurame *Osphronemus gourmay* merupakan salah satu spesies yang menjadi target peningkatan produksi perikanan budidaya 353% oleh

¹⁾Dep. Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Institut Pertanian Bogor

KKP pada tahun 2014. Ketersediaan benih sangat menentukan keberhasilan program KKP tersebut. Ikan gurame mencapai matang gonad pertama dalam waktu relatif lama, yaitu 2-3 tahun. Hal ini diduga akan menjadi salah satu kendala penyediaan benih ikan gurame untuk kegiatan pembesaran dalam rangka mendukung pencapaian target produksi nasional. Selain itu, metode pemijahan ikan gurame

juga masih bersifat alami, sehingga produksi benih tidak bisa dikontrol dan diprediksi dengan baik. Hingga saat ini, penelitian yang berkaitan dengan peningkatan produksi ikan gurame masih terbatas pada perbaikan komposisi pakan yang memberikan pertumbuhan yang tinggi. Selanjutnya, teknologi yang bisa diaplikasikan untuk mempercepat produksi ikan gurame matang gonad belum ada. Oleh karena itu, diperlukan alternatif pemecahan masalah lambatnnya ikan gurame mencapai matang gonad.

Induk "semang" (*surrogate broodstock*) yang diproduksi menggunakan metode transplantasi sel testikular (TST) yang banyak mengandung sel stem/punca spermatogonia telah dibuktikan bisa menghasilkan keturunan ikan target hasil perkawinan antara ikan resipien jantan dan betina (Okutsu *et al.*, 2006a). Sel spermatogonia memiliki kemampuan memperbanyak diri sendiri (*self-renewal*) dan berkembang menjadi spermatozoa dan telur (Okutsu *et al.*, 2006b). Aplikasi TST ikan gurame pada ikan resipien yang matang gonad lebih cepat daripada ikan gurame dan pemijahannya dapat dilakukan secara terkontrol diduga merupakan metode alternatif pemecahan masalah produksi benih ikan gurame.

Sebagai langkah awal pengembangan teknologi TST pada ikan gurame, pada tahun 2009 telah dilakukan pengembangan metode disosiasi sel testikular ikan gurame, analisis komposisi sel testikular ikan gurame dari berbagai ukuran bobot, penentuan umur larva ikan nila yang kompeten sebagai resipien dan analisis kolonisasi sel donor dalam gonad ikan nila resipien. Sel gonad ikan gurame berhasil terkolonisasi pada gonad ikan nila. Namun demikian, jumlah individu dan sel donor yang terkolonisasi masih relatif rendah. Salah satu yang diduga menjadi penyebab rendahnya keberhasilan transplantasi pada tahap pertama ini adalah persentase sel spermatogonia dari ikan gurame ukuran 1 kg/ekor yang digunakan sebagai sel donor adalah relatif rendah, sekitar 20% populasi sel testikular hasil disosiasi. Analisis komposisi sel testikular ikan gurame muda; berukuran sekitar 500 g/ekor menunjukkan bahwa lebih dari 50% sel testikularnya merupakan spermatogonia. Penggunaan donor yang mengandung spermatogonia lebih banyak diduga dapat meningkatkan persentase kolonisasi dan jumlah sel donor terkolonisasi. Oleh karena itu, pada penelitian kedua, tahun 2010, transplantasi dilakukan menggunakan sel donor dari ikan gurame muda untuk meningkatkan keberhasilan transplantasi.

Selanjutnya, hasil penelitian terbaru pada ikan trout pelangi menunjukkan bahwa penggunaan ikan

resipien triploid ($3n$) yang steril bisa meningkatkan keberhasilan transplantasi dan keturunannya adalah semua ikan target (Okutsu *et al.*, 2007). Hasil yang sama dengan ikan trout pelangi diduga dapat juga diperoleh pada ikan gurame. Selain itu, gabungan dua pendekatan yaitu penggunaan sel donor dari ikan gurame muda dan resipien ikan triploid diharapkan dapat memaksimalkan keberhasilan kolonisasi sel testikular ikan gurame pada gonad ikan resipien. Pada penelitian ini digunakan ikan nila sebagai resipien. Ikan nila memiliki waktu matang gonad pertama sekitar 4 bulan, jauh lebih cepat daripada ikan gurame. Selain itu, ikan nila dapat dipelihara dalam wadah terkontrol dan dapat dipijahkan secara buatan.

Penelitian ini ditujukan untuk membandingkan keberhasilan kolonisasi sel donor dari ikan gurame dalam gonad ikan nila resipien diploid ($2N$) dan triploid ($3N$), serta membandingkan kemampuan kolonisasi sel donor ikan gurame strain blue saphir dan bastar. Tujuan akhir dari penelitian ini adalah membuat induk ikan "semang" hasil transplantasi sel spermatogonia yang dapat menghasilkan benih ikan gurame dalam waktu lebih cepat dibandingkan bila menggunakan induk ikan gurame normal, dan produksi benihnya relatif sama dengan ikan gurame normal. Induk 'semang' yang dihasilkan dapat berguna bagi percepatan produksi benih ikan gurame dan mendukung program peningkatan produksi perikanan budidaya nasional, khususnya ikan gurame.

BAHAN DAN METODE

Disosiasi sel testikular ikan gurame

Disosiasi sel testikular ikan gurame untuk mendapatkan sel spermatogonia dilakukan menggunakan metode yang dihasilkan pada penelitian PSI-IPB 2009 (Alimuddin *et al.*, 2009). Ikan gurame yang digunakan berasal dari petani ikan gurame sekitar Bogor dan BBPBAT Sukabumi. Ikan gurame 2 strain (bastar dan blue sapphire) dengan bobot tubuh sekitar 400-800 gram/ekor dipelihara dalam hapa yang dipasang di kolam.

Ikan gurame jantan dipilih untuk diambil testisnya. Testis dibersihkan menggunakan larutan phosphate buffer salin (PBS) dan kemudian dipotong-potong kecil sepanjang sekitar 0,3 cm dalam cawan Petri. Potongan jaringan testikular diinkubasi dalam larutan tripsin 0,5% selama 1 jam atau hingga semua sel terdisosiasi sempurna. Hasil disosiasi dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf, disentrifugasi untuk

mengendapkan sel dan membuang larutan tripsin, dan kemudian disuspensi kembali dengan menambahkan PBS. Suspensi sel testikular hasil disosiasi disimpan di atas es selama persiapan dan pelaksanaan transplantasi. Untuk meyakinkan bahwa sebagian besar sel testikular hasil disosiasi merupakan sel spermatogonia yang ditandai dengan ukuran sel yang besar, maka sampel suspensi sel diambil dan diamati di bawah mikroskop.

Produksi larva ikan nila triploid

Penguasaan teknik pembuahan secara buatan sangat diperlukan dalam proses triploidisasi. Pada penelitian tahun 2009 telah berhasil dikembangkan metode pembuahan buatan untuk ikan nila dengan derajat pembuahan telur relatif tidak berbeda dengan hasil pemijahan alami. Ikan nila dipijahkan secara alami di dalam akuarium yang dilengkapi dengan pengatur suhu air agar relatif konstan, dan aerasi untuk menjaga ketersediaan oksigen terlarut. Setelah induk betina mengeluarkan telur 1-2 kali, ikan nila jantan dan betina diambil dan disimpan di wadah terpisah. Telur dikeluarkan dari induk betina dengan cara mengurut (*stripping*) perut dari arah kepala ke arah urogenital, dan telur ditampung di atas cawan Petri. Sperma juga dikeluarkan dengan cara *stripping* dan dimasukkan ke dalam cawan Petri yang telah berisi telur nila. Larutan fisiologis 0,9% NaCl ditambahkan ke dalam cawan Petri untuk mencampurkan sperma dan telur secara merata. Pembuahan telur diinduksi dengan menambahkan air ke dalam cawan Petri, dibiarkan sekitar 4 menit agar cukup waktu bagi sperma membuahi telur-telur yang ada. Air dalam cawan Petri diganti beberapa kali untuk membuang sisa-sisa sperma. Saat penambahan air ke dalam cawan Petri dicatat untuk menentukan waktu pelaksanaan kejutan panas (*heat shock*) untuk perlakuan triploidisasi. Kejutan panas dilakukan saat 4 dan 5 menit setelah pembuahan (pada suhu inkubasi embrio sekitar 28°C) dengan suhu kejutan 41°C selama 3,5 menit (Hussain *et al.*, 1991). Embrio hasil perlakuan triploidisasi dan kontrol tanpa diberi kejutan panas diinkubasi dalam akuarium yang dilengkapi aerasi sebagai penyuplai oksigen dan *heater* untuk menjaga agar suhu air stabil. Setelah menetas, larva dipindahkan ke akuarium yang lain.

Konfirmasi keberhasilan triploidisasi dilakukan menggunakan metode penghitungan jumlah maksimum nukleoli per sel setelah ikan berumur sekitar 2 bulan. Metode preparasi nukleolus mengikuti prosedur Alimuddin (1994).

Transplantasi sel testikular ikan gurame

Metode transplantasi sel donor dilakukan seperti yang telah dikembangkan pada penelitian PSI-IPB tahun 2009. Sekitar 10.000 sel testikular hasil disosiasi yang dilarutkan dalam PBS diinjeksi ke setiap larva ikan nila hasil triploidisasi dan larva ikan nila normal sebagai kontrol. Transplantasi sel dilakukan di bawah mikroskop menggunakan mikroinjektor. Sel diinjeksikan ke rongga perut (*peritoneal cavity*) antara kuning telur dan tulang vertebrata. Embrio dan larva hasil transplantasi dipelihara dalam akuarium yang dilengkapi dengan sistem aerasi. Setelah berumur lebih dari 2 bulan, gonad diambil untuk mengetahui kolonisasi sel donor dalam gonad individu resipien.

Deteksi kolonisasi sel donor

Deteksi kolonisasi sel donor dilakukan menggunakan metode PCR. Metode ekstraksi DNA, sekuen primer dan program PCR yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan sel donor dalam gonad ikan nila resipien 2N dan 3N dilakukan seperti dijelaskan dalam Alimuddin *et al.*, (2009). Jumlah individu resipien yang membawa sel donor pada resipien triploid dan diploid dihitung untuk menentukan efektivitas transplantasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Disosiasi dan transplantasi sel

Seperti diperlihatkan pada Tabel 1, dengan nilai *gonado somatic index* (GSI) yang relatif sama (0,1 - 0,2%), jumlah sel spermatogonia (4,0 - 20,0 juta sel) ikan gurame strain bastar sangat bervariasi dan secara umum lebih banyak dibandingkan dengan strain blue sapphire (3,5-9,3 juta sel). Pada penelitian tahun 2009, sel donor yang digunakan dalam transplantasi berasal dari ikan gurame bastar. Dengan variasi jumlah sel spermatogonia yang tinggi, keberhasilan transplantasi mungkin juga akan bervariasi.

Dengan keterbatasan alat mikroinjeksi, untuk memanfaatkan secara maksimal larva ikan nila yang ada, maka transplantasi dilakukan menggunakan larva ikan nila umur 1 - 4 hari. Namun demikian, ternyata larva ikan nila umur 1 hari ternyata masih rentan sehingga kelangsungan hidupnya relatif rendah dibandingkan dengan menggunakan larva umur 2 - 4 hari (Tabel 2). Oleh karena itu, kegiatan

transplantasi sel selanjutnya menggunakan larva ikan nila umur 2 - 4 hari.

Tabel 1. Jumlah sel spermatogonia ikan gurame strain bastar dan blue saphire.

Strain ikan gurame	Bobot Tubuh (g)	Bobot Gonad (g)	GSI (%)	Σ Sel Testikular	Σ Spermatogonia
Bastar	598,82	0,0791	0,013	65.200.000	18.400.000
	530,91	0,0582	0,011	49.900.000	9.700.000
	430,00	0,0762	0,018	115.000.000	20.000.000
	703,00	0,1603	0,022	145.500.000	14.250.000
	700,00	0,1252	0,017	26.704.000	4.000.000
Blue saphire	471,53	0,0652	0,014	31.500.000	5.100.000
	432,85	0,0633	0,015	49.500.000	3.500.000
	518,00	0,0875	0,017	32.925.000	9.300.000
	827,00	0,1513	0,018	138.625.000	6.300.000
	608,00	0,1169	0,019	26.704.000	4.000.000

Keterangan:
spermatogonia ditentukan berdasarkan ukuran sel; sekitar 10 µm atau lebih.

Tabel 2. Kelangsungan hidup larva ikan nila umur 1-4 hari yang ditransplantasi sel testikular ikan gurame strain bastar dan blue saphire.

Strain ikan gurame donor	Umur larva ikan nila resipien (hari)	Jumlah larva ikan nila transplan (ekor)	Kelangsungan hidup (%) ^{*)}
Bastar	1	42	83,3
	2	43	95,3
	3	48	97,0
	4	40	100,0
Blue saphire	1	31	51,0
	2	43	97,7
	3	42	92,8
	4	40	100,0

Keterangan:

^{*)} kelangsungan hidup ikan nila dihitung 7 hari setelah transplantasi.

Dengan kondisi pemeliharaan dan umur ikan yang sama (sekitar 4 bulan), ukuran tubuh relatif sama, tetapi bobot gonad dan nilai GSI ikan nila resipien 3N yang ditransplantasi dengan sel dari ikan gurame bastar cenderung lebih besar dibandingkan dengan blue saphire (Tabel 3). Selanjutnya, bobot gonad dan nilai GSI bervariasi cukup besar. Hal ini mungkin berhubungan dengan variasi jumlah sel spermatogonia donor yang ditransplantasikan. Selain itu, jenis kelamin juga mungkin mempengaruhi. Namun demikian, saat dilakukan analisis, secara visual gonad belum bisa dibedakan testis atau ovum

sehingga jenis kelamin ikan belum bisa juga ditentukan.

Tabel 3. Bobot gonad, bobot tubuh dan nilai GSI ikan nila resipien triploid umur sekitar 4 bulan.

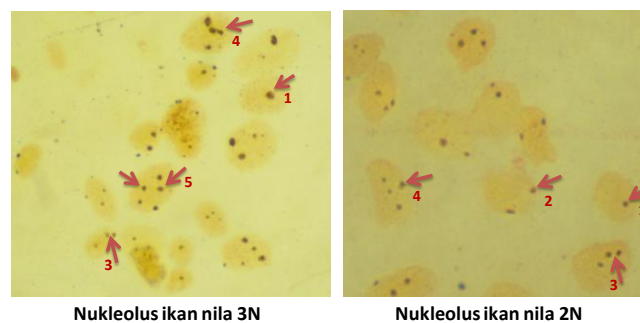
Strain ikan gurame donor	Bobot gonad ikan nila resipien (g)	Bobot tubuh (g)	GSI (%)
Bastar	0,060±0,040	33,98±8,65	0,160±0,100
Blue saphire	0,029±0,027	32,41±8,95	0,082±0,068

Keterangan:

nilai merupakan rata-rata dari 10 ekor ikan. Bobot gonad, bobot tubuh dan nilai GSI ikan kontrol 2N (n=4) secara berturut-turut adalah 0,010±0,003; 32,693±5,878 dan 0,030±0,010.

Analisis ploidi dan kolonisasi sel donor

Analisis nukleolus menunjukkan bahwa jumlah maksimal nukleolus per sel pada ikan nila diploid 2N adalah 4, sedangkan pada ikan triploid 3N adalah 6 nukleolus per sel (Gambar 1). Selanjutnya, keberhasilan triploidisasi yang dicapai menggunakan kejutan panas adalah 88,5% (23/26).

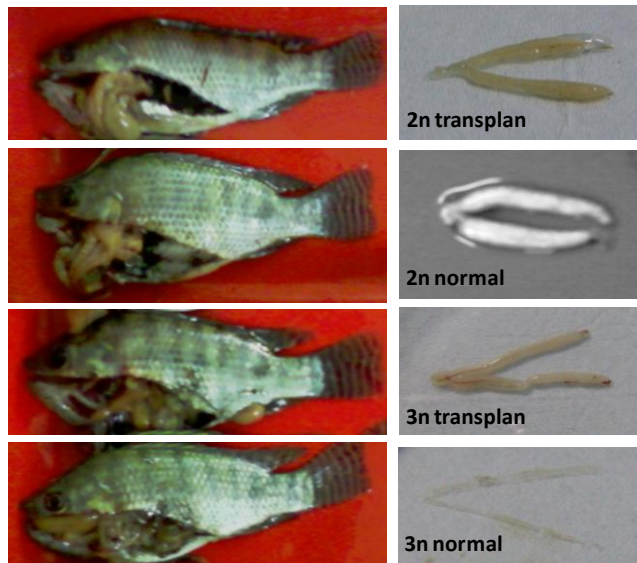


Gambar 1. Jumlah nukleolus per sel pada ikan triploid (3N) dan diploid (2N). Tanda panah menunjukkan nukleolus. Angka di dekat tanda panah merupakan jumlah nukleolus per sel.

Sementara itu, seperti ditunjukkan pada Gambar 2, gonad ikan nila diploid 2N tanpa transplantasi terlihat berwarna putih susu; tanda bahwa gonad sudah mulai atau sudah matang. Ukuran gonad ikan nila resipien 2N dan 3N relatif sama, sedangkan gonad ikan nila 3N tanpa transplantasi adalah rudimenter dan diduga steril.

Dengan menggunakan metode PCR dengan DNA yang diekstraksi dari gonad, beberapa sampel memiliki produk PCR dengan ukuran pita DNA yang sama dengan kontrol positif dari DNA ikan gurame (Gambar 3 - atas, ditunjukkan dengan tanda kepala panah). Hal tersebut menunjukkan kolonisasi sel

donor dalam gonad ikan nila resipien. Pada penelitian 2009, analisis PCR tidak bisa mendeteksi keberadaan sel donor dalam gonad ikan resipien. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah sel donor terkolonisasi dalam gonad ikan nila resipien lebih banyak dibandingkan dengan hasil penelitian tahun 2009. Hal ini diduga berhubungan dengan penggunaan sel donor dari ikan gurame muda (ukuran 400 - 800 gram/ekor). Keberhasilan kolonisasi menggunakan resipien ikan triploid lebih tinggi (78%; 7 dari 9 ikan yang dianalisa) dibandingkan daripada ikan diploid (50%; 3 dari 6 ekor). Dengan demikian, penggunaan ikan resipien triploid juga dapat meningkatkan keberhasilan kolonisasi sel donor.

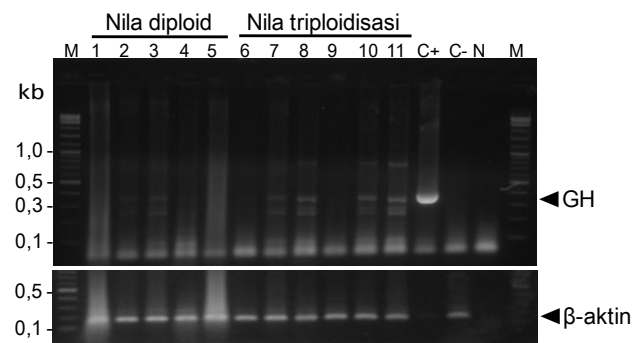


Gambar 2. Ukuran tubuh (kiri) dan gonad (kanan) ikan nila diploid 2N dan triploid 3N normal tanpa transplantasi (normal) dan hasil transplantasi (transplan) pada ikan nila umur sekitar 4 bulan.

Dari 7 ekor ikan nila resipien yang mengandung sel donor, 4 ekor (80%) di antaranya adalah berasal dari ikan yang ditransplantasi menggunakan sel donor dari ikan gurame bastar. Hal ini menunjukkan bahwa keberhasilan kolonisasi sel donor dari ikan gurame bastar sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan sel donor ikan gurame blue sapphire (75%). Perbedaan jumlah sel spermatogonia antara ikan gurame bastar dan blue sapphire diduga menjadi faktor penyebab perbedaan persentase kolonisasi ini.

Keberhasilan kolonisasi sel spermatogonia ikan gurame dalam gonad ikan resipien meningkat dengan menggunakan ikan nila triploid. Namun demikian, analisis PCR dengan cetakan DNA hasil ekstraksi dari sperma beberapa ekor ikan nila resipien

yang telah matang gonad menunjukkan belum adanya sperma ikan gurame. Faktor yang diduga menjadi penyebab adalah adanya keterlambatan spermatogenesis/oogenesis sel donor dalam gonad ikan nila resipien. Oleh karena itu, analisis diferensiasi sel donor perlu dilakukan untuk mengetahui fase dimana perkembangan sel donor mulai lambat atau tidak terjadi diferensiasi. Selanjutnya, penelitian untuk memacu perkembangan sel donor tersebut dalam gonad ikan nila resipien perlu dilakukan agar diperoleh sperma/telur ikan gurame dalam gonad ikan resipien. Tidak kurang dari 100 ekor ikan nila 3N hasil transplantasi masih ada, sehingga analisis PCR dapat dilanjutkan setelah ikan-ikan tersebut mencapai matang gonad.



Gambar 3. Deteksi kolonisasi sel donor dalam gonad ikan nila resipien diploid (nomor 1-5) dan hasil triploidisasi (nomor 6-11) dengan menggunakan metode PCR. Gambar atas adalah hasil elektroforesis dengan produk PCR menggunakan primer spesifik gen GH ikan gurame, sedangkan gambar bawah adalah kontrol internal *loading* DNA menggunakan primer β -aktin. C+ adalah produk PCR menggunakan DNA dari ikan gurame, sedangkan C- adalah menggunakan DNA dari ikan nila bukan hasil transplantasi. N adalah produk PCR tanpa cetakan DNA. M adalah marka ukuran DNA (2-log ladder, BioLabs, New England).

KESIMPULAN

Transplantasi menggunakan ikan nila resipien triploid dengan sel donor dari ikan gurame muda menghasilkan kolonisasi lebih baik dibandingkan dengan menggunakan resipien ikan nila diploid. Kolonisasi sel donor ikan gurame strain bastar dan blue sapphire dalam gonad ikan nila resipien relatif sama.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA IPB No.: 16/13.24.4/SPK/PSN/2010. Terima kasih disampaikan kepada Sdr. Darmawan Setiabudi dan Jasmadi atas bantuannya dalam pelaksanaan transplantasi dan pemeliharaan ikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alimuddin. 1994. Pengaruh waktu awal kejutan panas terhadap keberhasilan triploidisasi ikan lele local (*Clarias batrachus* L.). Skripsi. Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan IPB.
- Alimuddin, Z.M.Jr and Arfah, H. 2009. Teknologi transplantasi dala, rekayasa produksi benih ikan gurame (*Osphronemus gouramy*). Laporan Hasil Penelitian Strategis Internasional IPB.
- Hussain, M.G., Chatterji, A., McAndrew, B.J, and Johnstone R. 1991. Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. using pressure, heat and cold shocks. Theor. Appl. Genet.: 81:6-12.
- Okutsu, T., Yano A., Nagasawa K., Shikina S., Kobayashi T, Takeuchi K, and Yoshizaki G. 2006a. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. J Reprod Dev 52:685
- Okutsu, T., Suzuki K., Takeuchi, Y., Tekeuchi T., and Yoshizaki G. 2006b. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional egg in fish. Proc Natl Acad Sci USA 103:2725-2729.
- Okutsu, T., Shikina, S., Kanno, M., Takeuchi Y., and Yoshizaki, G. 2007. Production of trout offspring from triploid salmon parents. Science 317: 1517.